





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی قزوین

بررسی میزان باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل مناطق مختلف استان قزوین

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر قجریگی

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر محمودی
جناب آقای دکتر نوریان

دانشجو:

آناهیتا حسین پور

ماه مهر
سال ۹۸

بیان مسئله و مقدمه



عسل به عنوان یک محصول شناخته شده طبیعی دارای مواد مغذی و خواص دارویی قابل توجه است. این ماده غذایی به دلیل طعم شیرین، مواد مغذی و خواص سلامت بخش در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرد(۱).

تولید عسل سالانه در جهان حدود ۱/۴ میلیون تن تخمین زده می شود. آسیا بزرگترین تولید کننده عسل است که تقریباً ۴۰ درصد تولید جهانی را تشکیل می دهد(۲). پیش بینی می شود که بازار جهانی عسل تا سال ۲۰۲۲ به ۲/۴ میلیون تن برسد(۳).

بیان مسئله و مقدمه



فرآورده های زنبور عسل می توانند از راه های مختلفی آلوده شوند. منابع آلوده کننده محیطی شامل فلزات سنگین، آفت کش ها و باکتری های بیماری زا می باشند(۴).

آنتی بیوتیک ها مهم ترین گروه از داروهای ضد میکروبی هستند که به طور وسیعی برای انسان و حیوانات تجویز می شوند. آنتی بیوتیک ها برای درمان یا پیشگیری از بیماری هایی هم چون لوک آمریکائی و لوک اروپائی مورد استفاده قرار می گیرند(۵).



بیان مسئله و مقدمه





اهداف پژوهش

هدف کلی:

بررسی میزان باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل
مناطق مختلف استان قزوین

اهداف اختصاصی :

۱. تعیین میزان باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل
مناطق مختلف استان قزوین

۲. مقایسه میزان باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل
مناطق مختلف استان قزوین با استانداردهای حد مجاز



فرضیات پژوهش

۱. باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل مناطق مختلف استان قزوین وجود دارد.

۲. میزان باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل مناطق مختلف استان قزوین بالاتر از حد مجاز است.



مقدمه

سابقه تحقیق

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادهات



مروری بر مطالعات و متون گذشته

محققین	سال	یافته ها
بانوهی و همکاران	۲۰۰۹	در اسپانیا آزمایشاتی به منظور تعیین باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین روی ۵۶۷ نمونه عسل انجام شد. بر طبق نتایج به دست آمده ۲۴ (۴/۲۲٪) نمونه حاوی آنتی بیوتیک تتراسایکلین بودند(۶).
نومن و همکاران	۲۰۱۲	پژوهشی در آلمان بر روی ۴۷ نمونه عسل وارداتی و ۳۰ نمونه عسل تولید داخل انجام شد، این مطالعه نشان داد ۲۲ نمونه از عسل‌های وارداتی دارای باقیمانده آنتی بیوتیک و عمدتاً "سولفامتوکسازول بود و از عسل های تولید داخل تنها یک نمونه حاوی باقیمانده آنتی بیوتیک بود(۷).
محمودی و همکاران	۲۰۱۴	این مطالعه در قزوین و با روش ELISA انجام شد. طبق نتایج از ۱۳۵ نمونه عسل ۷۱/۸۵٪ دارای باقیمانده آنتی بیوتیک بود(۲).



مروری بر مطالعات و متون گذشته

محققین	سال	یافته ها
محمودی و همکاران	۲۰۱۴	این تحقیق در اردبیل و با روش های FPT ، ELISA و HPLC انجام شد . نتایج نشان داد از ۱۴۵ نمونه عسل ۳۴ نمونه حاوی باقیمانده آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین بود(۸).
فضل آرا و همکاران	۲۰۱۴	مطالعه در خوزستان و با روش HPLC به منظور تعیین تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین در نمونه های عسل انجام شد. طبق نتایج به دست آمده از ۶۰ نمونه عسل ۴۶ نمونه دارای باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین بود(۹).
گلارینی و همکاران	۲۰۱۵	۲۷ نوع از داروهای دامپزشکی در نمونه های عسل کشور ایتالیا با روش LC-MS/MS آزمایش شدند. طبق نتایج به دست آمده از ۷۴ نمونه عسل در ۹ نمونه (۱۲٪) سطح سولفونامیدها تایید شد(۱۰).



مروری بر مطالعات و متون گذشته

محققین	سال	یافته ها
چن و همکاران	۲۰۱۶	مطالعه‌ای در چین به منظور سنجش آنتی بیوتیک های گروه تتراسایکلین در نمونه های عسل با روش های ELISA و ایمونو کروماتوگرافی انجام شد. نتایج نشان داد که مقادیر TC، OTC و CTC در نمونه های عسل برابر با $40 \mu\text{g/L}$ بود (۱۱).
گایلن و همکاران	۲۰۱۷	تعیین همزمان ۹ سولفونامید توسط LC-MS برای کنترل عادی نمونه های خام عسل در کشور اسپانیا انجام شد. طبق نتایج به دست آمده از مطالعه ۴۵ نمونه از ۲۱۵ مورد دارای سولفونامیدها بودند (۱۲).
باراسو و همکاران	۲۰۱۹	در ۶۶ نمونه عسل جمع آوری شده از استان های مختلف ایتالیا آزمایشاتی انجام شد. طبق نتایج به دست آمده از مطالعه ۴۰ نمونه دارای آنتی بیوتیک بودند، در ۳۶ نمونه تتراسایکلین یافت شد (۱۳).



جمع بندی و نتیجه گیری بیان مسئله

با توجه به مخاطراتی که مصرف عسل های حاوی باقیمانده آنتی بیوتیک روی سلامتی مصرف کنندگان دارد و مشکلاتی که باقیمانده های آنتی بیوتیک در صادرات عسل ایجاد کرده است، پایش باقیمانده های آنتی بیوتیک در عسل و انجام اقدامات کنترلی جهت به حداقل رساندن مصرف آنتی بیوتیک امری بسیار ضروری می باشد.



مواد و روش کار

نوع مطالعه: توصیفی - تحلیلی

جامعه: نمونه های عسل

مکان پژوهش: مناطق مختلف استان قزوین (الموت شرقی، الموت غربی، تاکستان و آیک)

مواد و روش کار

نمونه ها، روش نمونه گیری و فرمول نمونه گیری

با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه باقیمانده های آنتی بیوتیک در عسل شیوع تتراسایکلین ۲۹٪ می باشد. تعداد ۸۰ نمونه عسل بر اساس فرمول تعیین حجم نمونه از مناطق مختلف استان قزوین (الموت شرقی، الموت غربی، تاکستان و آیک) جمع آوری شد. نمونه ها تحت شرایط مناسب (دمای ۴ درجه سانتی گراد) به آزمایشگاه ایمنی مواد غذایی منتقل و تا زمان شروع آزمایشات در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند(۸).

$$n = \frac{(z_{1-\frac{\alpha}{2}})^2 \times p(1-p)}{d^2}$$

مواد و روش کار

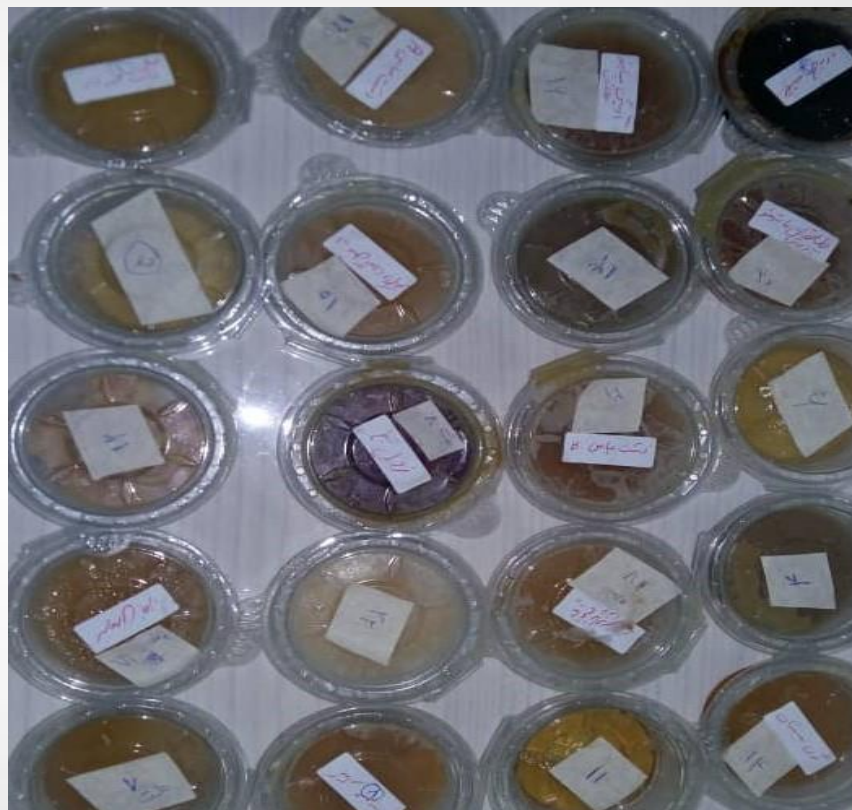
جمع آوری نمونه های عسل



اضافه نمودن محلول متانول



سانتریفیوژ نمونه ها





مواد و روش کار



مواد و روش کار

دستگاه ELISA READER

آماده سازی نمونه ها قبل از آنالیز با ELISA READER





مواد و روش کار

سنجش میزان باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل

روش ELISA

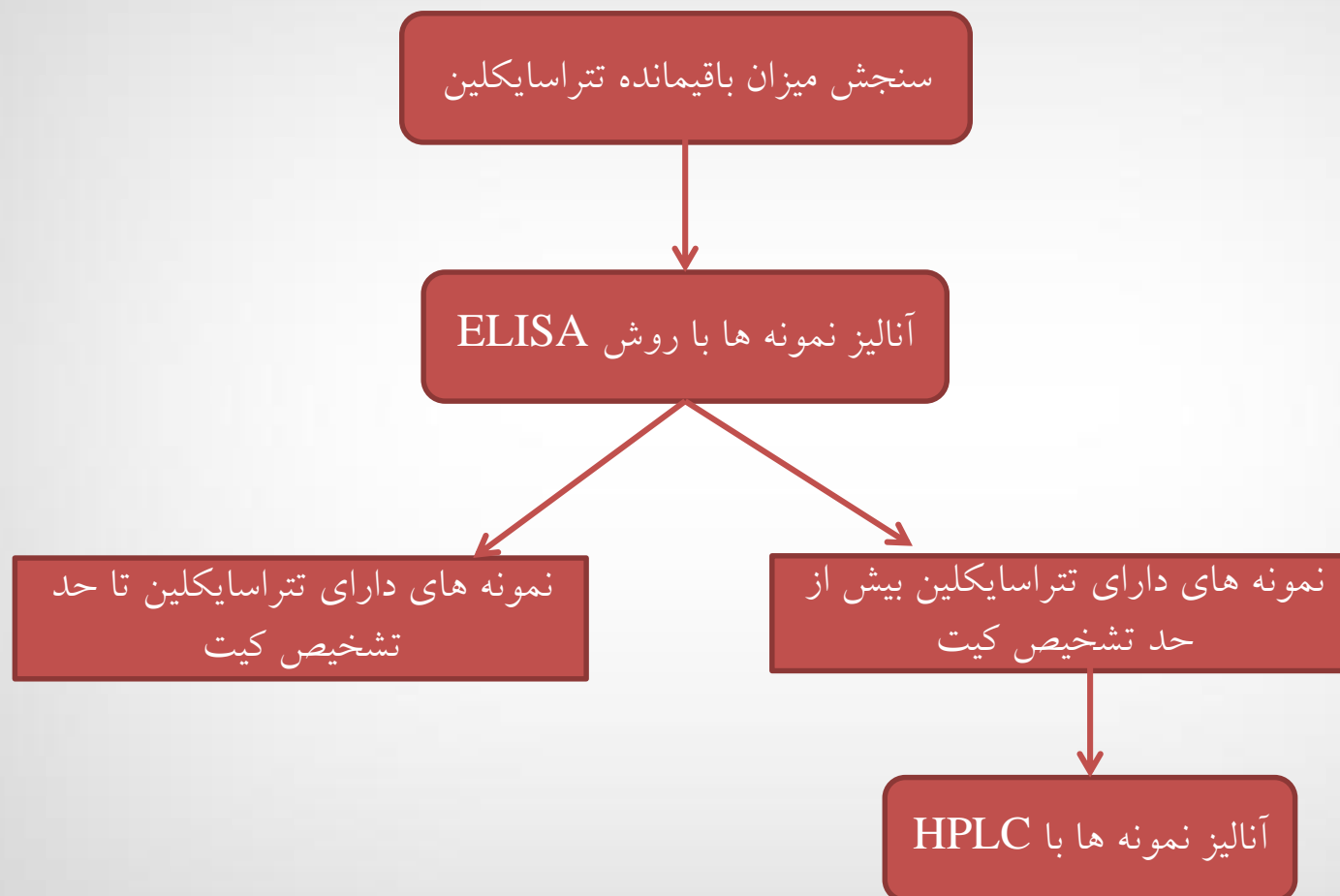
برای اندازه گیری میزان باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل از

روش ELISA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت استفاده شد.

(RIDASCREEN tetracycline ELISA kit (R 1501), Europeroxima, Netherlands)



مواد و روش کار



مواد و روش کار

روش HPLC



به منظور اندازه گیری دقیق میزان آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه هایی که در روش ELISA بالاتر از حد تشخیص کیت گزارش شدند از روش آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده گردید.

در این آنالیز از دتکتور UV ، از طول موج ۲۷۶ نانومتر و از سرعت فاز متحرک یک میلی لیتر بر دقیقه برای آنالیز استفاده شد.



مواد و روش کار

آنالیز آماری

داده ها وارد نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ شدند سپس آزمون آماری Mann-Whitney برای آنالیز تفاوت بین روش ELISA و HPLC در سطح معنی دار $p < 0.05$ مورد استفاده قرار گرفت.



مواد و روش کار

محدودیت های پژوهش

محدودیت مطالعه حاضر در تعداد نمونه ها با توجه به هزینه بالای کیت الایزا و آنالیز نمونه ها با HPLC بود.

یافته ها

نتایج حاصل از آنالیز نمونه های عسل به روش ELISA

نتایج آنالیز نمونه ها با روش ELISA نشان داد که در تمام نمونه ها باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین وجود داشت. در ۴ نمونه (۵٪) میزان تتراسایکلین بیش از حد تشخیص کیت بود که از این ۴ نمونه ۲ نمونه در منطقه تاجکستان، یک نمونه در منطقه آبیگ و یک نمونه در منطقه الموت غربی بود. نمونه های منطقه الموت شرقی فاقد باقیمانده آنتی بیوتیک بیش از حد تشخیص کیت بودند.



یافته ها

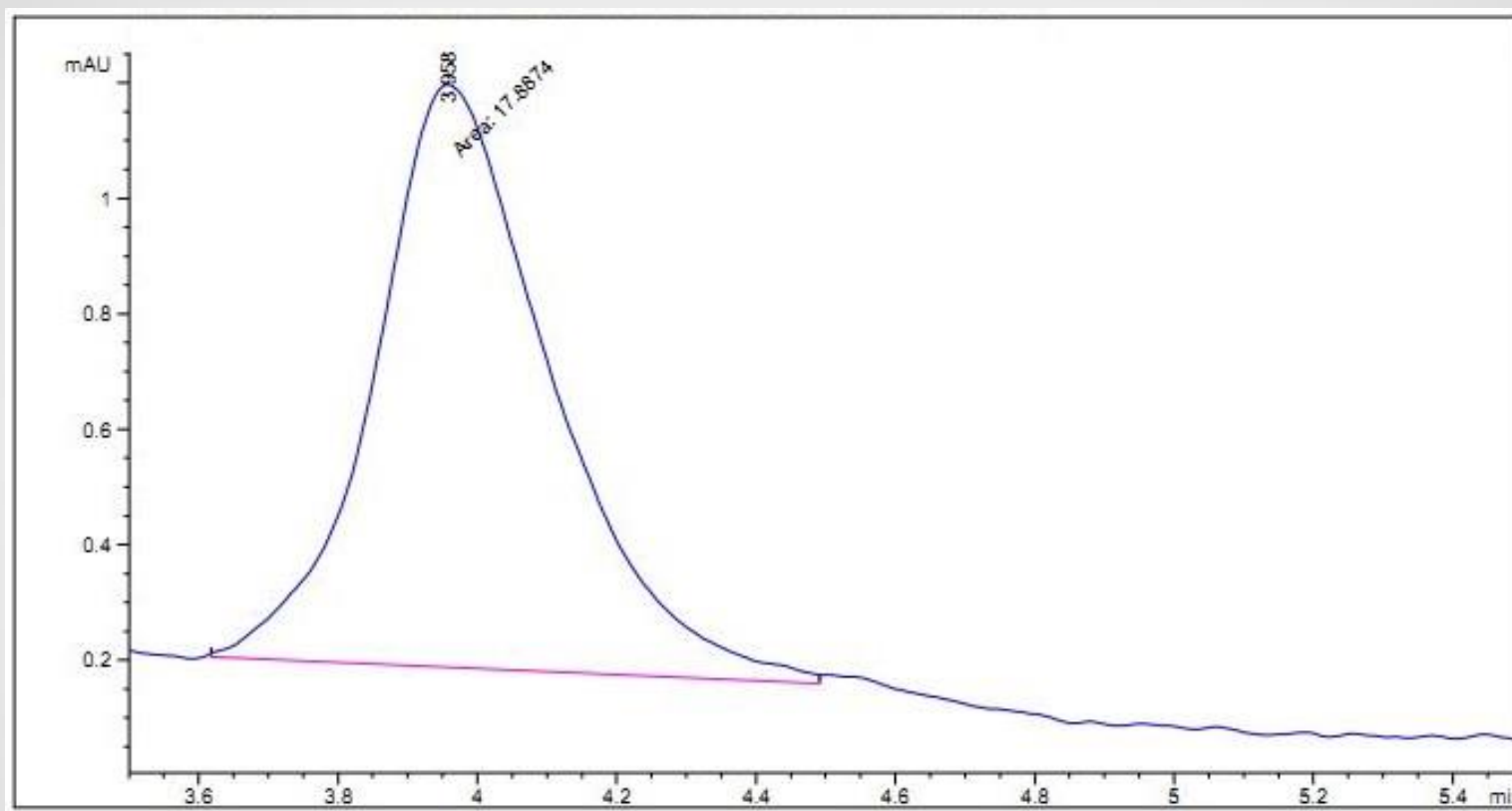
نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های عسل به روش ELISA

مناطق	تعداد نمونه ها	میانگین	انحراف معیار	حداقل (ppb)	حداکثر (ppb)	حد مجاز (ppb)	نمونه‌های دارای تتراسایکلین بیش از حد تشخیص کیت (%)
تاکستان ^a	۱۴	۱۵/۹۴	۱۱/۱۶	۶/۶۳	۴۰/۰۰	۱۰۰	۱۴/۲۸
آبیک ^b	۲۱	۷/۴۷	۸/۴۰	۱/۲۶	۴۰/۰۰	۱۰۰	۴/۷۶
الموت شرقی ^b	۲۳	۹/۴۷	۹/۹۶	۲/۱۹	۳۸/۸۰	۱۰۰	۰
الموت غربی ^b	۲۲	۸/۶۸	۹/۰۰	۱/۲۶	۴۰/۰۰	۱۰۰	۴/۵۴
کل	۸۰	۹/۸۶	۹/۸۰	۱۱/۳۴	۱۵۸/۸	۱۰۰	۵/۰

حروف مختلف (a و b) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنادار می باشد ($p < 0.05$).



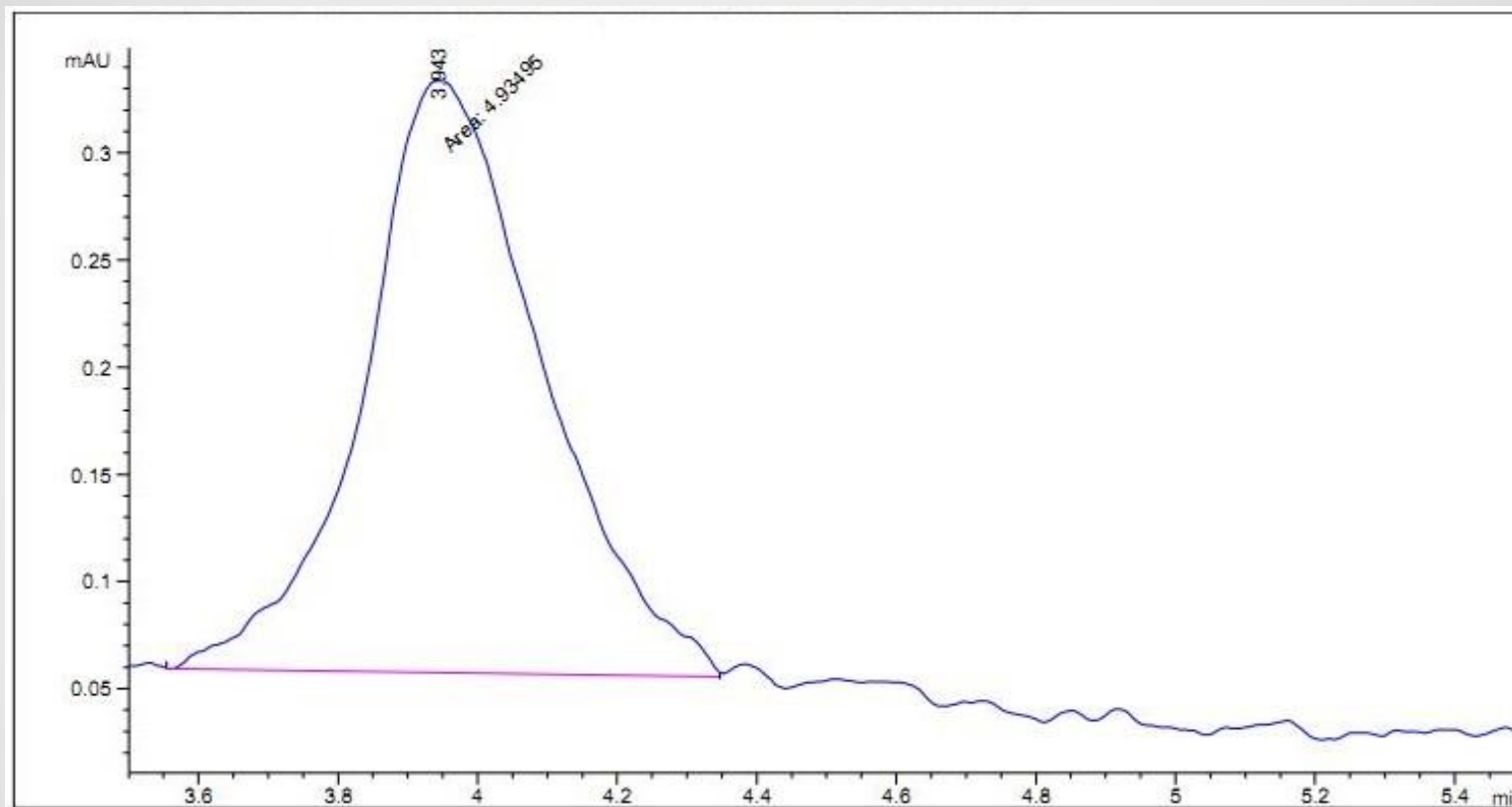
نتایج حاصل از آنالیز نمونه های عسل به روش HPLC



پیک کروماتوگرام نمونه شماره ۱ - غلظت محاسبه شده ۵۲/۵۸ ppb



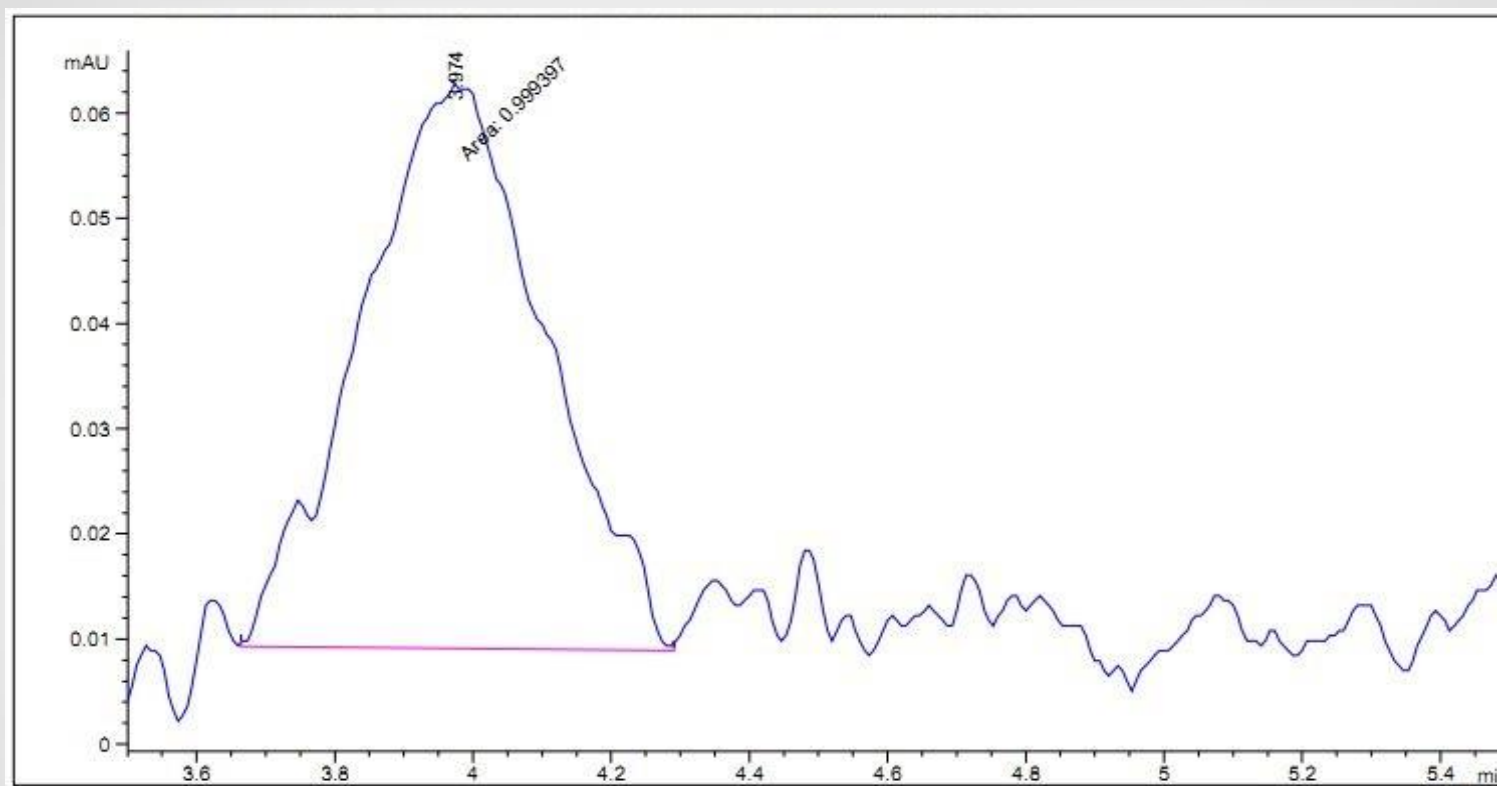
نتایج حاصل از آنالیز نمونه های عسل به روش HPLC



پیک کروماتوگرام نمونه شماره ۲ - غلظت محاسبه شده ۱۴/۴۹ ppb



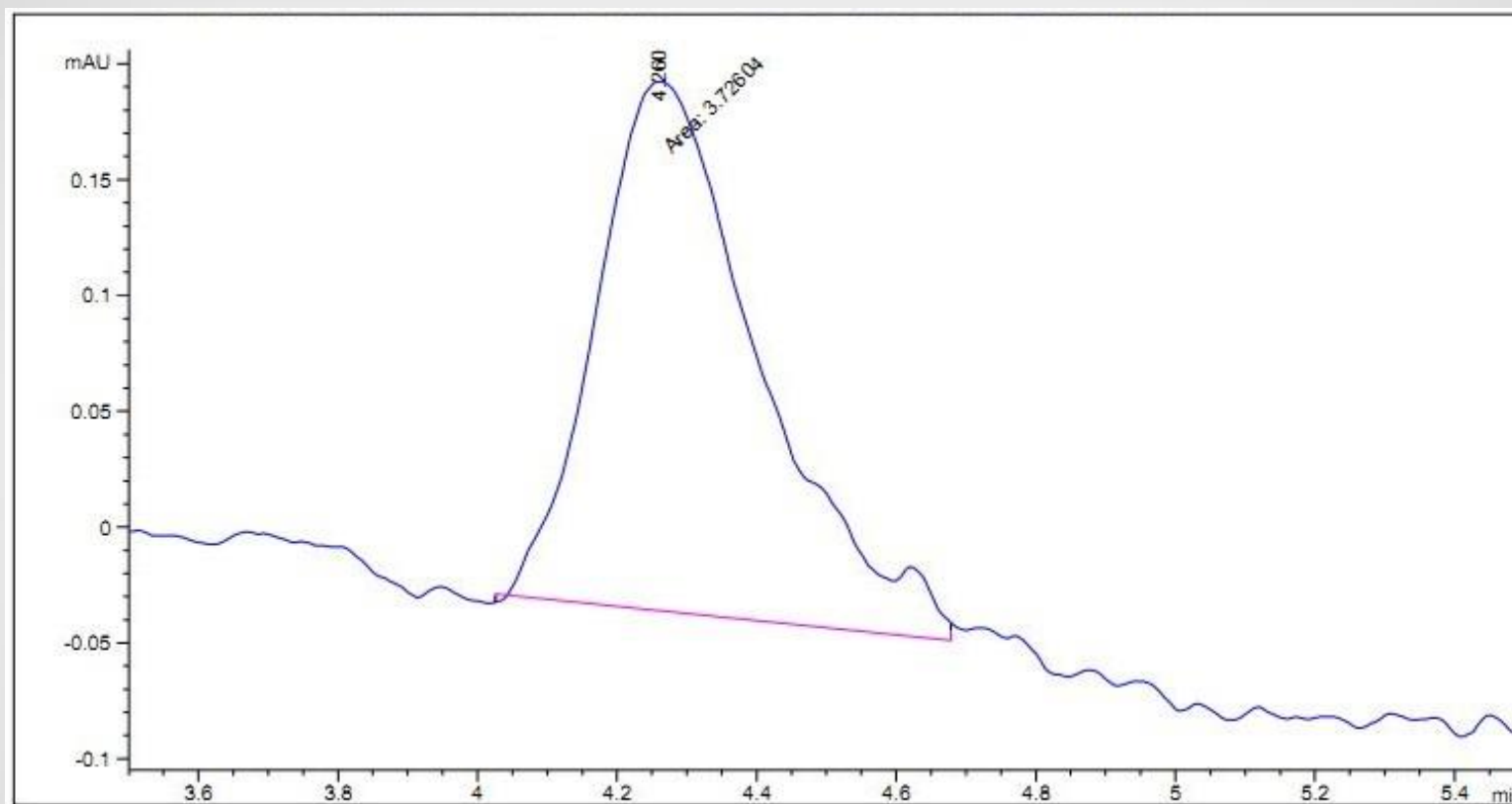
نتایج حاصل از آنالیز نمونه های عسل به روش HPLC



پیک کروماتوگرام نمونه شماره ۳ - غلظت محاسبه شده ۲/۹۲ ppb



نتایج حاصل از آنالیز نمونه های عسل به روش HPLC



پیک کروماتوگرام نمونه شماره ۴ - غلظت محاسبه شده ۱۰/۹۳ ppb



مقایسه نتایج حاصل از آنالیز نمونه های عسل در روش ELISA با نتایج HPLC

روش آنالیز	نمونه شماره ۱	نمونه شماره ۲	نمونه شماره ۳	نمونه شماره ۴
ELISA	۴۰/۰۰	۴۰/۰۰	۴۰/۰۰	۴۰/۰۰
HPLC	۵۲/۵۸	۱۴/۴۹	۲/۹۲	۱۰/۹۳



بحث

ارزیابی که با روش ELISA و HPLC انجام شد، نشان داد در تمام نمونه ها آنتی بیوتیک تتراسایکلین وجود دارد، اما نمونه ای حاوی تتراسایکلین بیش از حد مجاز وجود نداشت.

بین مقادیر تتراسایکلین تعیین شده در روش ELISA و HPLC تفاوت معنی داری وجود داشت به گونه ای که مقادیر تتراسایکلین به دست آمده از روش HPLC به طور معنی داری کمتر از روش ELISA بود، علت این تفاوت را می توان چنین بیان نمود که در روش ELISA علاوه بر تشخیص آنتی بیوتیک تتراسایکلین احتمال تشخیص سایر متابولیت های آن نیز وجود دارد اما در روش HPLC به طور اختصاصی آنتی بیوتیک تتراسایکلین سنجش می شود.



مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادهات

بحث

محقق	سال مطالعه	کشور	نوع آنتی بیوتیک	روش سنجش	تعداد کل نمونه ها	تعداد نمونه های دارای آنتی بیوتیک	مقایسه با مطالعه حاضر
بانوهی و همکاران	۲۰۰۹	اسپانیا	تتراسایکلین	LC-FD	۵۶۷	۲۴	مطابقت داشت
جانز و همکاران	۲۰۰۹	ترکیه	اکسی تتراسایکلین	LC-MS	۵۰	صفر	عدم تطابق
محمودی و همکاران	۲۰۱۴	ایران (اردبیل)	اکسی تتراسایکلین	FPT ELISA HPLC	۱۴۵	۳۴	مطابقت داشت



مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادهات

بحث

محقق	سال مطالعه	کشور	نوع آنتی بیوتیک	روش سنجش	تعداد کل نمونه ها	تعداد نمونه های دارای آنتی بیوتیک	مقایسه با مطالعه حاضر
محمودی و همکاران	۲۰۱۴	ایران (قزوین)	تتراسایکلین، انروفلوکساسین، پنی سیلین، کلر آمفنیکل، جنتامایسین، تایلوزین و سولفانامید	ELISA	۱۳۵	۱۳۵	مطابقت داشت
فضل آرا و همکاران	۲۰۱۴	ایران (خوزستان)	تتراسایکلین واکسی تتراسایکلین	HPLC	۶۰	۳۱	مطابقت داشت
باراسو و همکاران	۲۰۱۹	ایتالیا	تتراسایکلین	Biochip Multi-Array	۴۰	۳۶	مطابقت داشت

نتیجه گیری کلی

در حال حاضر وجود آنتی بیوتیک ها در عسل مشکل بسیار جدی برای تجارت عسل ایجاد کرده است. با توجه به اینکه عسل ماده غذایی مهمی برای سلامتی انسان است، نگرانی های زیادی درباره باقیمانده های آنتی بیوتیک در عسل وجود دارد.

مطالعه حاضر نشان داد که نمونه های عسل جمع آوری شده از مناطق مختلف استان قزوین حاوی مقادیری از آنتی بیوتیک تتراسایکلین بود. با توجه به گستردگی آلودگی عسل ها با آنتی بیوتیک تتراسایکلین اقدامات لازم جهت کنترل فرآورده های غذایی با منشا دامی به خصوص عسل امری بسیار ضروری است.



پیشنهاها

پیشنهادهای پژوهشی

۱- بررسی باقیمانده سایر آنتی بیوتیک ها در نمونه های عسل استان قزوین و سایر استان های کشور

۲- بررسی باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در نمونه های عسل سایر استان های کشور



پیشنهادهات

پیشنهادهای اجرایی

۱- ارائه اقدامات کنترلی برای به حداقل رساندن مصرف آنتی بیوتیک ها مانند آموزش زنبورداران

۲- ارائه نتایج مطالعات به سازمان غذا و دارو و اداره دامپزشکی جهت سازماندهی اقدامات کنترلی

۳- شناسنامه دار نمودن عسل ها جهت آگاهی مصرف کنندگان از وجود یا عدم وجود آنتی بیوتیک و نوع آنتی بیوتیک مصرف شده در عسل



منابع

1. Arabsorkhi B, Sereshti H. Determination of tetracycline and cefotaxime residues in honey by micro-solid phase extraction based on electrospun nanofibers coupled with HPLC. *Microchemical Journal*. 2018; 140:241-247.
2. Mahmoudi R, Norian R, Pajohi-Alamoti M. Antibiotic residues in Iranian honey by ELISA. *International journal of food properties*. 2014;17(10):2367-73.
3. Carreck NL. Special issue: honey. Taylor & Francis. *Journal of Apicultural Research*; 2018; 57(1).
4. Bogdanov S, Haldimann M, Luginbühl W, Gallmann P. Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*. 2007;46(4):269-75.
5. Forsgren E, Locke B, Sircoulomb F, Schäfer MO. Bacterial diseases in honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2018;5(1):18-25.
6. Bonvehí JS, Gutierrez AL. Residues of antibiotics and sulfonamides in honeys from Basque Country (NE Spain). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009;89(1):63-72.
7. Näumann G, Mahrt E, Himmelreich A, Mohring A, Frerichs H. Traces of contamination—well preserved in honey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2012;7(1):35-43.
8. Mahmoudi R, Moosavy M, Norian R, Kazemi S, Nadari MRA, Mardani K. Detection of oxytetracycline residues in honey samples using ELISA and HPLC methods. *Pharmaceutical Sciences*. 2014;19(4):145.
9. Fazlara, A. Najafzadeh Varzi, H Izadi, B. Survey on tetracycline and oxytetracycline antibiotic residues in honeys produced in some honey hives in Khuzestan province using HPLC method. *Journal of Veterinary Medicine of Iran*. 2014;10(2):65-73.
10. Galarini R, Saluti G, Giusepponi D, Rossi R, Moretti S. Multiclass determination of 27 antibiotics in honey. *Food Control*. 2015; 48:12-24.
11. Chen Y, Kong D, Liu L, Song S, Kuang H, Xu C. Development of an ELISA and immunochromatographic assay for tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline residues in milk and honey based on the class-specific monoclonal antibody. *Food Analytical Methods*. 2016; 9(4):905-14.
12. Guillén I, Guardiola L, Almela L, Núñez-Delicado E, Gabaldón JA. Simultaneous Determination of Nine Sulphonamides by LC-MS for Routine Control of Raw Honey Samples. *Food Analytical Methods*. 2017;10(5):1430-41.
13. Barrasso R, Bonerba E, Savarino A, Ceci E, Bozzo G, Tantillo G. Simultaneous Quantitative Detection of Six Families of Antibiotics in Honey Using A Biochip Multi-Array Technology. *Veterinary sciences*. 2019;6(1):1.



تشکر و قدردانی..

مراتب سپاس و قدردانی خویش را از سر صدق و اخلاص به محضر استاد بزرگوار جناب آقای دکتر قجریگی، که در نهایت سعه صدر و خالصانه همواره با حمایت ها و رهنمودهای ارزشمند و سازنده، اینجانب را در انجام این پایان نامه مورد محبت خویش قرار داده اند، ابراز می دارم.

همچنین از حمایت های ارزنده استاد گرانقدر جناب آقای دکتر محمودی که در کلیه مراحل تحقیق با راهنمایی و مشاوره های اندیشمندانه خود برای تکمیل و ارتقاء کیفیت این رساله کمک موثری داشتند، نهایت تشکر و قدردانی را به جا می آورم.

تشکر ویژه خود را تقدیم می کنم به استاد ارجمند جناب آقای دکتر نوریان که با کمال صبر و نهایت سخاوت، دانسته های خویش را در اختیار بنده گذاشتند؛ کمال تشکر و امتنان را دارم.

از خانواده عزیز و گرامی ام که در طول تحصیل همواره سنگ صبور و حامی من بودند و سعی کردند که من دغدغهای به جز کسب علم و دانش نداشته باشم ممنون و سپاسگزارم و از خداوند بزرگ سلامتی، پیشرفت و بهروزی برایشان آرزو مندم.

از کارشناسان محترم دانشکده کمال تشکر را دارم.